



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



НАКОПЛЕНИЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОКИНИНОВ В ТКАНЯХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ВВЕДЕНИИ В КОРНЕОБИТАЕМУЮ СРЕДУ ЗЕАТИНА, ЗЕАТИНРИБОЗИДА И ПРОТОНОФОРА

Коробова А.В.^{1*}, Ахиярова Г.Р.¹, Медведев С.С.², Веселов С.Ю.³, Кудоярова Г.Р.¹

¹Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, Проспект Октября, 69;

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургский университет, Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная 7–9;

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Башкирский государственный университет, Россия, 450076, Уфа, ул. Заки Валиди, 32;
*muksin@mail.ru

Резюме

Через час после введения экзогенного зеатина в питательный раствор растений пшеницы содержание цитокининов возрастало в 30 раз по сравнению с контролем, что в 5 раз превышало уровень накопления гормонов в растениях, инкубированных на растворе рибозида зеатина той же молярности. Различие в скорости накопления экзогенных гормонов было связано не со скоростью их поглощения или распада, а с особенностями распределения (преимущественным накоплением зеатина в клетках, и его рибозида – в апопласте [Коробова и др., 2013], где цитокинины более доступны к действию цитокининоксидаз). Ингибирование вторично активного трансмембранного переноса резко снижало содержание зеатина в клетках корней, но влияние данной обработки на распределение рибозида зеатина было менее заметным. Таким образом, выявлена меньшая зависимость от наличия градиента водорода процессов поглощения и удержания внутри клеток рибозида зеатина по сравнению с зеатином, что может быть важно для выполнения этой формой цитокининов транспортной функции.

Ключевые слова: *Triticum durum*; цитокинины; зеатин; зеатин рибозид; трансмембранный перенос; протонифор; иммуногистохимическая локализация

Цитирование - Коробова А.В., Ахиярова Г.Р., Медведев С.С., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р. Накопление и распределение цитокининов в тканях растений пшеницы при введении в корнеобитаемую среду зеатина, зеатинрибозида и протонифора. *Биомика*. 2018. 10(1). С. 62-68. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-14

CYTOKININ ACCUMULATION AND DISTRIBUTION IN TISSUES OF WHEAT PLANTS AFTER INTRODUCING ZEATIN, ZEATIN RIBOSIDE AND PROTONOPHORE INTO ROOT MEDIA

Korobova A.V.^{1*}, Akhiyarova G.R.¹, Medvedev S.S.², Veselov S.Yu.³, Kudoyarova G.R.¹

¹Ufa Institute of Biology, Ufa Federal Research Centre, RAS, Russia, 450054, Ufa, Prospekt Oktyabrya, 69;

²St. Petersburg State University, Russia, 199034, St. Petersburg, Universitetskaya naberezhnaya, 7–9;

³Bashkir State University, Russia, 450076, Ufa, Zaki-Validi St., 32;

*muksin@mail.ru

Resume

An hour after the introduction of exogenous zeatin into the nutrient solution of wheat plants, the content of cytokinins increased by 30 compared to the control, which is 5 times higher than the level of accumulation of hormones in plants incubated on the zeatin riboside solution of the same molarity. The difference in the rate of accumulation of exogenous hormones was associated not with the rate of their absorption or decay, but with the features of the distribution (the predominant accumulation of zeatin in the cells, and its riboside - in the apoplast [Korobova et al., 2013], where cytokinins are more available to destruction with cytokinin oxidase. Inhibition of the secondary active transmembrane transport sharply reduced the content of zeatin in the root cells, but the effect of this treatment on the zeatin riboside distribution was less pronounced. Thus, there is a lesser dependence of processes of zeatin riboside cell absorption and its retention in cells on the presence of proton gradient as compared with zeatin. This may be important for the performance of transport function by zeatin riboside.

Keywords: *Triticum durum*; cytokinins; zeatin; zeatin riboside; membrane transport; protonophore; immunohistochemical localization

Citation - Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Medvedev S.S., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R. Cytokinin accumulation and distribution in tissues of wheat plants after introducing zeatin, zeatin riboside and protonophore into root media. *Biomcs*. 2018. 10(1). P. 62-68. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-14 [In Russian]

Введение

Цитокинины в присутствии ауксинов индуцируют деление клеток, активируют рост растяжением у семядолей двудольных растений, при повышенных концентрациях вызывают образование побегов в культуре каллусной ткани. Обработка цитокининами предотвращает распад хлорофилла и клеточных органелл у изолированных листьев, задерживает процессы старения, способствует образованию и функционированию апикальных меристем и развитию цветков, снимает эффект апикального доминирования, вызываемый ауксинами. [Kulaeva, Kuznetsov / Кулаева, Кузнецов, 2002; Романов, 2009]. Исследования О.Н.Кулаевой (O.N.Kulaeva) [1962], впервые продемонстрировавшей влияние на функции побега цитокининов, поступающих из корней, инициировали работы, направленные на выявление сигнальной роли этих гормонов. Выявлено участие цитокининов в нитратном сигналинге [Sakakibara, 2006] и передаче из корней в побег сигналов о подсыхании почвы [Dodd, 2005]. В экспериментах с локальной индукцией *IPT*-гена была показана способность цитокининов, синтезируемых в корнях, влиять на устьичную проводимость листьев [Vysotskaya et al., 2010]. Увеличение притока этих гормонов из корней, в основном, связывают с активацией их синтеза [Sakakibara, 2006], а снижение – с ускорением распада цитокининов [Vysotskaya et al., 2009]. Вместе с тем, обнаружение способности ряда переносчиков азотистых оснований [Burkle et al., 2003] и их рибозидов [Hirose et al., 2005] транспортировать цитокинины через мембраны клеток, указывает на потенциальную возможность регуляции притока

цитокининов из корней непосредственно на уровне их загрузки в сосуды.

С помощью протонофора карбонилцианид-м-хлорофенилгидразона, шунтирующего электрохимический градиент ионов H^+ и подавляющего вторично-активный транспорт веществ через мембраны, нами было показано, что поглощение свободных оснований цитокининов клетками корней пшеницы предотвращает их загрузку в ксилемные сосуды и отток из корней в побеги [Kudoyarova et al., 2014]. В отличие от свободных азотистых оснований, экзогенные рибозиды цитокининов в меньшей степени накапливались внутри клеток корней пшеницы, а зависимость их поглощения от скорости транспирации указывала на преимущественный транспорт рибозилированных форм цитокининов по апопласту [Korobova et al. / Коробова и др., 2013]. Данные о роли вторично-активных переносчиков в мембранном транспорте рибозидов цитокининов весьма противоречивы [Hirose et al., 2005]. Поэтому представляло интерес сравнить влияние протонофора на поглощение, накопление и распределение цитокининов при их введении в среду обитания корней пшеницы в виде свободных азотистых оснований и рибозилированных форм. Ранее нами было показано, что ингибирование вторично активного транспорта резко снижает накопление цитокининов в клетках при обработке корней растений пшеницы зеатином [Kudoyarova et al., 2014]. Настоящая работа посвящена изучению влияния протонофора КЦХФ на иммулокализацию цитокининов в клетках корней, обработанных рибозидом зеатина. Поскольку известно, что цитокининоксидазы играют важную роль в контроле поступления цитокининов извне (поль gate-keeper

[Brugiere et al., 2003]), в данной работе оценивалась их активность при введении экзогенных гормонов.

Материалы и методы

Исследования проводили на проростках твердой яровой пшеницы (*Triticum durum* Desf., сорта Безенчукская 139) в лабораторных условиях. Семена проращивали в темноте в течение трех суток на водопроводной воде при 24°C. Затем проростки пересеживали на среду Хогланда-Арнона, разведенную в 10 раз, и выращивали при освещенности 400 $\mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$ и 14-часовой продолжительности светового дня. Температура воздуха в течение светового периода была в пределах 22-25°C. Шестисуточные растения рассаживали по 10 штук в сосуды со 100 мл питательного раствора Хогланда-Арнона для адаптации.

В возрасте 7 суток проводили обработку растений экзогенными цитокининами. Для этого в треть сосудов добавляли раствор зеатина (3+) в концентрации $4.0 \times 10^{-7} \text{М}$, в другую треть – раствор зеатинрибозида (3Р+) той же концентрации, а к оставшейся трети в питательный раствор экзогенный цитокинин не добавляли (контроль).

Для подавления вторично-активного транспорта в питательный раствор одновременно с цитокинином добавляли протонофор КЦХФ до конечной концентрации 10^{-6}М . Фиксацию побегов и корней для иммулокализации цитокининов производили через 1 ч после введения гормона в среду. Скорость транспирации определяли по уменьшению веса сосуда с растениями за 1 ч (для предотвращения испарения воды поверхность сосудов прикрывали фольгой).

Концентрацию цитокининов в экстракте из побегов и корней растений и в питательной среде анализировали с помощью иммуноферментного анализа [Veselov et al. / Веселов и др., 1999]. Надежность этого метода при определении цитокининов в растениях пшеницы этого возраста была подтверждена путем сравнения результатов иммуноанализа и высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией [Kudoyarova et al., 2014]. Распределение цитокининов в тканях корней в зоне всасывания (фрагменты корней длиной 1 см отрезали на расстоянии 3 мм от кончика корня) оценивали с помощью иммуногистохимического подхода, используя специфические антитела к рибозиду зеатина, с помощью модификации, позволяющей отдельно выявлять присутствие в клетках или зеатина или его рибозилированной формы [Veselov et al. / Веселов и др., 1999; Kudoyarova et al., 2014]. Антитела к рибозидам зеатина имеют высокую кроссреактивность по отношению к свободному основанию зеатина и низкое сродство (на уровне нескольких процентов) - к

производным другого типа цитокининов. Раздельное выявление свободных оснований цитокининов и их рибозилированных форм основано на разных способах их конъюгирования с белками цитоплазмы перед дегидратацией. Рибозилированные формы цитокининов конъюгируют с помощью периодата натрия, который активирует гидроксильные группы сахаров путем их окисления, что обеспечивает их связывание с белками цитоплазмы. Для конъюгации свободных оснований с белками используют смесь альдегидов. Показано, что при этом не происходит конъюгации рибозилированных форм цитокининов [Veselov et al. / Веселов и др., 1999], в результате чего они вымываются в процессе дегидратации и не вносят своего вклада в иммунное окрашивание срезов. Поскольку, после конъюгации рибозидов цитокининов с помощью периодата натрия, ткани фиксируют смесью альдегидов, при этом может происходить связывание с белками сначала рибозидов, а затем - свободных оснований. Модификация, предложенная Веселовым и Вальке [Veselov et al. / Веселов и др., 1999], позволяет предотвратить конъюгацию свободных оснований с белками за счет повышения pH раствора при обработке ткани смесью альдегидов (показано, что при pH 9,6 конъюгирования свободных азотистых оснований в присутствии смеси альдегидов не происходит. Таким образом, оригинальный способ конъюгации гормонов позволяет связать с белками только свободные основания (в смеси 0,1% глутарового альдегида и 4% параформальдегида, приготовленной на 0,1М фосфатном буфере (pH 7,2)) или их рибозиды (с помощью 20мМ раствором метапериодата натрия в 0,05 М карбонатном буфере (pH 9,6) с последующей фиксацией белков в смеси 0,1% глутарового альдегида и 4 % параформальдегида, приготовленной на 0,05М карбонатном буфере (pH 9,6), при которой связывания зеатина не происходит).

Активность цитокининоксидазы определяли по деградации изопентениладенозина (ИПА) [Vysotskaya et al., 2009; Veselov, Simonyan / Веселов, Симонян, 2004] через 6 ч после введения гормонов в среду. Растительный материал гомогенизировали в холодном (6°C) 0,1М имидазол-НСl буфере (pH 7,1) из расчета 2,5 мл буфера на 1 г тканей. Гомогенат центрифугировали при 12000g в течение 25 мин и супернатант фильтровали через бумажный фильтр. Для отделения белков от эндогенных цитокининов и их концентрирования к фильтрату добавляли равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. После центрифугирования при 5000 g в течение 15 мин осадок ресуспендировали в соответствующем буфере из расчета 0,5 мл буфера на 1,15 г навески. 50 мкл белкового препарата добавляли к 65 мкл смеси,

содержащей ИПА (30 нг/0,1 мл), имидазол-НСI буфер (рН=7,1) в конечной концентрации 0,04 М и ионы меди (0,1 мМ CuSO_4). Пробирки с реакционными смесями инкубировались в термостате при 37°C в течение 4 часов. Для остановки реакции и отделения белковой фракции от фракции гормонов к смесям приливали по 0,2 мл холодного этанола, выдерживали 40 мин при 4°C, и центрифугировали при 5000g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость анализировали с помощью иммуноферментного анализа в тест-системе для определения ИП/ИПА.

Эксперименты проводили 3 раза по 3–10 повторений (n) в каждом из них. Существенную (при $p < 0.05$) разницу между средними рассчитывали при помощи t-теста или двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA.

Результаты

На рис. 1 показано влияние КЦХФ на содержание зеатина и зеатинрибозидов в растениях пшеницы через 1 ч после введения экзогенных цитокининов в раствор Хогланда-Арнона. Можно видеть, что обработка экзогенными гормонами приводит к резкому повышению содержания цитокининов в растениях (почти в 30 раз – при введении зеатина и в 5 раз – в случае его рибозидов). Ингибирование вторично активного мембранного транспорта КЦХФ более чем в 2,5 раза снижало содержание цитокининов у растений, обработанных зеатином и лишь на 50% – зеатинрибозидом. При этом содержание цитокининов в растениях контрольного варианта не изменялось.

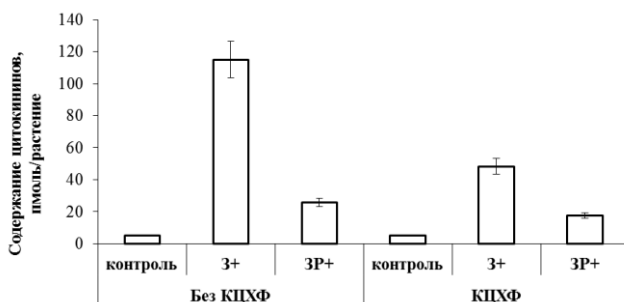


Рис. 1. Влияние карбонил-цианид-м-хлор-фенилгидразона (КЦХФ (10^{-6} М) на содержание цитокининов в 7-дневных растениях пшеницы после 1 ч экспозиции на среде с зеатином (3+) или зеатинрибозидом (3P+, 4.0×10^{-7} М). Контроль – раствор Хогланда-Арнона, разбавленный в 10 раз (n = 3). Fig. 1. Influence of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (10^{-6} M) on cytokinin content in 7-days wheat plants 1 h after treatment with zeatin ("3+") or zeatin riboside ("3P+", 4.0×10^{-7} M). "Контроль" – 0.1 strength Hoagland-Arnon solution (n = 3).

В процессе инкубации растений на среде с экзогенными цитокининами, их концентрация в питательном растворе снижалась примерно на треть по сравнению с исходной как при добавлении зеатина, так и его рибозидов. Под влиянием протонофора КЦХФ убыль экзогенных гормонов из раствора снижалась в среднем на 13% (с 28 ± 1 до 24 ± 1 и с 31 ± 1 до 27 ± 1 процентов от исходной концентрации гормонов при введении КЦХФ в среду с зеатином и зеатинрибозидом, соответственно). Скорость транспирации существенно не менялась под влиянием экзогенных цитокининов, но снижалась на примерно 30% по сравнению с исходной под влиянием протонофора (с 0,1 до 0,07 мг воды на растение в час) у обработанных как зеатином, так и зеатинрибозидом растений.

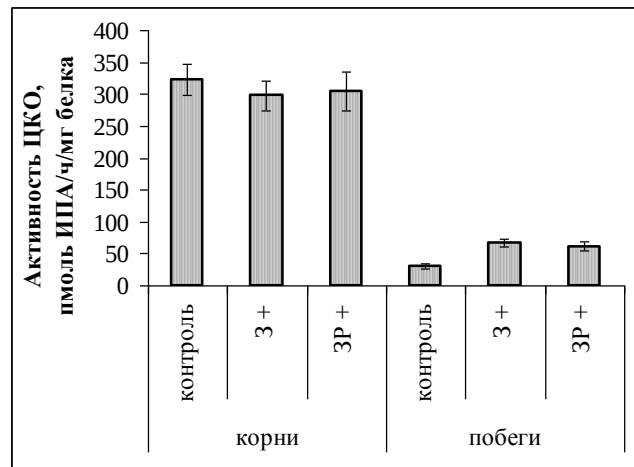


Рис. 2. Активность цитокининоксидазы в корнях и побегах 7-дневных растений пшеницы после 1 ч экспозиции на среде с зеатином (3+) или зеатинрибозидом (3P+, 4.0×10^{-7} М). Контроль – раствор Хогланда-Арнона, разбавленный в 10 раз (n = 3). Fig. 2. Cytokinin oxidase activity in roots and shoots of 7-days wheat plants 1h after treatment with zeatin ("3+") or zeatin riboside ("3P+", 4.0×10^{-7} M). "Контроль" – 0.1 strength Hoagland-Arnon solution (n = 3).

Активность цитокининоксидазы, рассчитанная на мг белка, была почти в 10 раз выше в корнях растений пшеницы по сравнению с побегами (рис. 2). Присутствие экзогенных гормонов в питательном растворе не влияло на активность фермента в корнях, но почти в 2 раза повышало ее в побегах. Обработка растений протонофором КЦХФ не приводила к значимому изменению активности цитокининоксидазы (данные не приводятся).

Инкубация корней растений пшеницы на растворе, содержащем рибозид зеатина, усиливала окрашивание на зеатинрибозид клеток поперечных

срезов зоны поглощения корней (рис. 3). Обработка зеатинрибозидом приводила к усилению окраски апопласта (рис. 3в). Обработка протонофором не оказывала существенного влияния на распределение зеатинрибозид в клетках корней, обработанных этим гормоном.

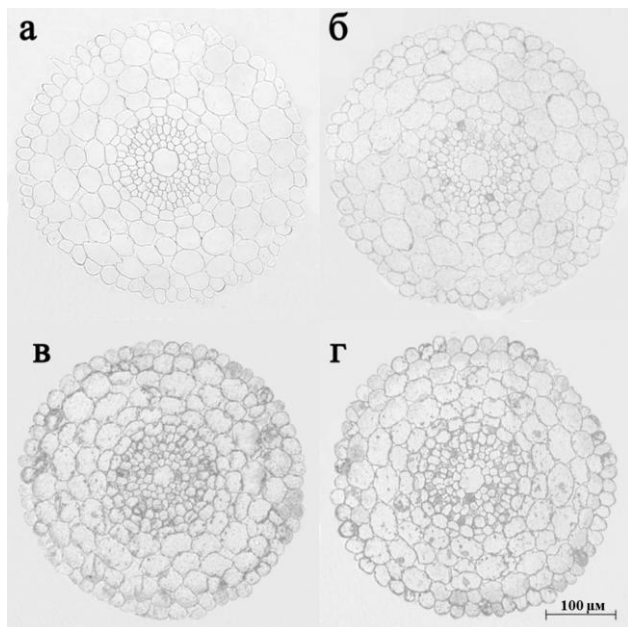


Рис. 3. Иммуногистохимическое окрашивание зеатинрибозид на поперечных срезах корней в зоне всасывания контрольных растений пшеницы (б), а также обработанных экзогенным рибозидом зеатина (в) и рибозидом зеатина в сочетании с протонофором (г); а – срез обработан неиммунной сывороткой (n = 10).

Fig. 3. Immunohistochemical staining of zeatin riboside on cross sections of roots in the absorbing zone of wheat control plants (б), and also treated with exogenous zeatin riboside (в) and zeatin riboside in combination with protonophore (г); а - the cross section was processed by non-immune serum (n = 10).

Обсуждение

Растения пшеницы, обработанные зеатином и его рибозидом, резко различались по уровню накопления цитокининов, а их обработка протонофором снижала содержание этих гормонов в растениях (рис 1). Можно было предположить, что различия в накоплении цитокининов обусловлены неодинаковой скоростью поглощения экзогенных гормонов растениями. Однако скорость убыли цитокининов из питательного раствора была примерно одинаковой у растений, инкубированных на среде с экзогенным зеатином и его рибозидом, что указывает на одинаковую скорость поглощения этих

форм цитокининов. Убыль экзогенных цитокининов из питательного раствора, хотя и снижалась под влиянием протонофора (в одинаковой степени у растений, обработанных зеатином и его рибозидом), но в гораздо меньшей степени по сравнению с резким падением уровня накопления гормонов в растениях. В то время как присутствие протонофора снижало поглощение цитокининов лишь на 13 и 14%, оно уменьшало содержание цитокининов в 1,5 и 2,6 раза у растений, обработанных рибозидом зеатина и его свободным основанием, соответственно. Таким образом, различия в содержании цитокининов у обработанных экзогенными зеатином и его рибозидом растений зависели от какого-то иного фактора, а не от различий в скорости их поглощения. Снижение транспирации на 30%, зарегистрированное под воздействием протонофора, могло быть существенным фактором в уменьшении накопления цитокининов у растений, обработанных рибозидом зеатина, поскольку ранее нами была показана зависимость поглощения этой формы цитокининов от транспирации [Korobova et al. / Коробова и др. 2013]. Тем не менее, в случае введения в растения зеатина, снижением транспирации на 30% нельзя было объяснить зарегистрированное уменьшение накопления цитокининов более чем в 2 раза под влиянием протонофора.

Можно было предполагать, что различия в уровне накопления цитокининов у растений, обработанных зеатином и его рибозидом, были связаны с неодинаковой скоростью их распада. Известно, что активность цитокининоксидазы может возрастать под влиянием экзогенных цитокининов [Lee et al., 2007]. Однако в наших опытах активность этого фермента возрастала под влиянием экзогенных цитокининов только в побегах, но не в корнях, и ее уровень не зависел от формы экзогенных цитокининов. Таким образом, различия в накоплении цитокининов не удалось связать с активностью ферментов, катализирующих распад этих гормонов. Тем не менее, обнаруженные различия в накоплении цитокининов могли быть следствием неодинакового распределения зеатина и его рибозидов между содержимым клеток и апопластом, поскольку это могло сказаться на доступности цитокининов для действия цитокининоксидазы.

Ранее нами был показан преимущественный транспорт экзогенного зеатина по симпласту корней, а его рибозидов – по апопласту [Korobova et al. / Коробова и др., 2013]. Было выявлено резкое снижение уровня зеатина в клетках корней под влиянием протонофора [Kudoyarova et al., 2014], что указывает на зависимость накопления зеатина в клетках от активного поглощения им гормона. Интенсивность окрашивания на цитокинины клеток

корней была ниже у растений, обработанных рибозидом зеатина по сравнению с растениями, обработанными зеатином [Korobova et al. / Коробова и др., 2013 и результаты настоящих экспериментов]. Ингибирование вторично активного транспорта вызвало лишь небольшие изменения в накоплении цитокининов в клетках корней при введении экзогенного рибозида зеатина (рис. 3). Таким образом, данные, полученные нами ранее и в ходе выполнения данной работы, свидетельствуют том, что у растений, обработанных экзогенным рибозидом зеатина, меньше цитокининов накапливалось в клетках, а уровень накопления в меньшей степени зависел от вторично активного трансмембранного переноса по сравнению с обработанными зеатином растениями.

Присутствие цитокининоксидаз в апопласте считается одним из механизмов защиты растений от проникновения извне экзогенных цитокининов, что позволило назвать эти ферменты gate-keeper (стражниками) [Brugiere et al., 2003]. Помимо апопласта в литературе описана внутриклеточная локализация цитокининоксидаз. Однако наличие в цитоплазме ограниченных мембранами компартментов, которые пространственно разделяют ферменты и их субстраты, снижает способность ферментов катализировать распад тех или иных соединений. Отсутствие подобных компартментов в апопласте делает находящиеся в нем цитокинины более доступными к каталитическому распаду под влиянием цитокининоксидаз. Таким образом, более низкий уровень накопления цитокининов у растений, обработанных рибозидом зеатина по сравнению с растениями, в которые вводили зеатин, можно объяснить присутствием большей доли этого

экзогенного гормона в апопласте (см. рис. 3), где он легче расщепляется цитокининоксидазой по сравнению с экзогенным зеатином, который преимущественно накапливается внутри клеток [Korobova et al. / Коробова и др., 2013]. А более резкое падение уровня цитокининов под влиянием ингибитора вторично активного трансмембранного переноса, которое наблюдали у обработанных зеатином растений (рис. 1), также можно объяснить уменьшением поглощения зеатина клетками [Kudoyarova et al., 2014], что увеличивает доступность цитокининов для ферментативного распада в апопласте клеток.

Рибозилированная форма с меньшей легкостью проникала в клетки, чем свободный зеатин, однако для ее сохранения внутри клеток в меньшей степени требовалась затрата энергии. Несмотря на то, что рибозид зеатина, как и зеатин, считается мобильной формой, способной проникать через клеточную мембрану, присутствие гидрофильного остатка рибозы должно снижать проницаемость липидного бислоя для этой формы цитокининов, по сравнению со свободным зеатином. Этим можно объяснить способность рибозида зеатина оставаться в клетках при обработке протонофором, приводящей к утечке из клеток зеатина.

Таким образом, показано, что вторично активное поглощение зеатина клетками может обеспечивать более высокий уровень цитокининов в растениях, в то время как подавление этого процесса с помощью протонофора - снижать накопление цитокининов за счет утечки цитокининов из клеток и повышения их доступности ферментативному расщеплению цитокининоксидазой в апопласте.

Литература / References

1. Brugiere N., Jiao S.P., Hantke S., Zinselmeier C., Roessler J.A., Niu X.M., Jones R.J., Habben J.E. Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. *Plant Physiology*. 2003. 132(3). P. 1228–1240. DOI: 10.1104/pp.102.017707
2. Burkle L., Cedzich A., Dopke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., Kuhn K., Frommer W.B. Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of Arabidopsis. *Plant J*. 2003. V. 34. P. 13–26. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2003.01700.x
3. Dodd I.C. Root-to-shoot signalling: assessing the roles of 'up' in the up and down world of long-distance signalling in planta. *Plant and Soil*. 2005. V.274. P.251-270. DOI 10.1007/s11104-004-0966-0
4. Hirose N., Makita N., Yamaya T., Sakakibara H. Functional characterization and expression analysis of a gene, OsENT2, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiol*. 2005. 138(1). P. 196–206. 10.1104/pp.105.060137
5. Korobova A.V., Vasinskaya A.N., Akhiyarova G.R., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R., Hartung W. Dependence of cytokinin distribution in plants on their physical and chemical properties and transpiration rate. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2013. 60(2). P. 193–199. DOI: 10.1134/S1021443713020131 (In Russian - Коробова А.В., Васинская А.Н., Ахиярова Г.Р., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р. Зависимость распределения цитокининов в растениях от скорости транспирации. *Физиология растений*. 2013. Т. 60(2). С. 184-191.)
6. Kulaeva O.N. Vliyanie kornej na obmen veshhestv list'ev v svyazi s problemoj dejstviya na list kinetina.

- Fiziologija rastenij*. 1962. Т. 9. С. 229-239. [Effect of roots on the leaf metabolism due to the problem of kinetin action on the leaf] (In Russian - Кулаева О.Н. Влияние корней на обмен веществ листьев в связи с проблемой действия на лист кинетина. *Физиология растений*. 1962. Т. 9. С. 229-239.)
7. Kulaeva O.N., Kusnetsov V.V. Recent advances and horizons of the cytokinin studying. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2002. 49(4). P. 561-574. (In Russian - Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. Новейшие достижения и перспективы в области изучения цитокининов. *Физиология растений*. 2002. Т. 49. С. 626-640.)
 8. Romanov G.A. How do cytokinins affect the cell? *Russian Journal of Plant Physiology*. 2009. 56(2). S. 268-290. DOI: 10.1134/S1021443709020174 (In Russian - Романов Г.А. Как цитокинины действуют на клетку // *Физиология растений*. 2009. Т. 56. С. 295-319.)
 9. Kudoyarova G.R., Korobova A.V., Akhiyarova G.R., Arkhipova T.N., Zaytsev D.Y., Prinsen E., Egutkin N.L., Medvedev S.S., Veselov S.Y. Accumulation of cytokinins in roots and their export to the shoots of durum wheat plants treated with the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP). *J. Exp. Bot.* 2014. 65(9). P. 2287-2294. DOI: 10.1093/jxb/eru113
 10. Lee D.J., Park J.Y., Ku S.J., Ha Y.M., Kim S., Kim M.D., Oh M.H., Kim J. Genome-wide expression profiling of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7 (ARR7) overexpression in cytokinin response. *Mol. Genet. Genomics*. 2007. 277(2). P. 115-137. DOI: 10.1007/s00438-006-0177-x
 11. Sakakibara H. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006. V. 57. P. 431-449. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231
 12. Vysotskaya L.B., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R. Effect on shoot water relations, and cytokinin and abscisic acid levels of inducing expression of a gene coding for isopentenyltransferase in roots of transgenic tobacco plants // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 3709-3717. DOI: 10.1093/jxb/erq182
 13. Vysotskaya L.B., Korobova A.V., Veselov S.Y., Dodd I.C., Kudoyarova G.R. 2009. ABA mediation of shoot cytokinin oxidase activity: assessing its impacts on cytokinin status and biomass allocation of nutrient deprived durum wheat. *Functional Plant Biology*. 36, 66-72. DOI: 10.1071/FP08187
 14. Veselov S.U., Valcke R., Van Onckelen H., Kudoyarova G. Cytokinin content and location in the leaves of the wild-type and transgenic tobacco plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 1999. V. 46. P. 26-33. (In Russian - Веселов С.Ю., Вальке Р., Ван Онкелен Х., Кудоярова Г.Р. Содержание и локализация цитокининов в листьях исходных и трансгенных растений табака *Физиология растений*. 1999. Т. 46. С. 34-40.)
 15. Veselov S.Yu., Simonyan M.V. Immunoenzyme analysis of cytokinins as an assay for cytokinin oxidase activity. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2004. V. 51(2). P. 266-270. (In Russian - Веселов С.Ю., Симонян М.В. Использование иммуноферментного анализа цитокининов для оценки активности цитокининоксидазы. *Физиология растений*. 2004. Т. 51(2). С. 297-302.)
 16. Vysotskaya L.B., Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R. Effect on Shoot Water Relations, and Cytokinin and Absciscic Acid Levels of Inducing Expression of a Gene Coding for Isopentenyltransferase in Roots of Transgenic Tobacco Plants // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 3709-3717. DOI: 10.1093/jxb/erq182
 17. Vysotskaya L.B., Korobova A.V., Veselov S.Y., Dodd I.C., Kudoyarova G.R. 2009. ABA mediation of shoot cytokinin oxidase activity: assessing its impacts on cytokinin status and biomass allocation of nutrient deprived durum wheat. *Functional Plant Biology*. 36, 66-72. DOI: 10.1071/FP08187